

申請者	学科名	人間情報工学科	職名	准教授	氏名	柳原 衛
調査研究課題	腹側被蓋野へ投射するカルビンディンを含む中脳橋被蓋ニューロンの検索					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	柳原 衛	情報工学部人間情報工学科・准教授	神経解剖学	全体	
	分担者					
調査研究実績の概要	<p>中脳の腹側部に位置する腹側被蓋野は、報酬系としての快の情動の生成などに関与している部位である。このVTAへの入力の一つに、中脳橋被蓋からのものが知られている。中脳橋被蓋は、外背側被蓋核および脚橋被蓋核より成り、コリン作動性ニューロンのほか、グルタミン酸作動性、あるいはGABA作動性をしめすニューロンで構成されている。また、これらのニューロンのなかに、カルビンディンなどのカルシウム結合タンパクを含むニューロンが存在することも知られている。本研究では、腹側被蓋野へフルオロゴールドを注入し逆行性標識細胞を検索するとともに、コリンアセチル転移酵素（ChAT）およびカルビンディンに対する免疫染色を同時におこない、腹側被蓋野へ投射する脚橋被蓋核および外背側被蓋核ニューロンにカルビンディンを含むものがあるかについて調べた。</p>					

調査研究実績  
の概要

実験動物として、ラットを使用した。麻酔されたラットを、脳定位装置に固定した後、間脳の視床に、蛍光性神経トレーサーであるフルオロゴールドをマイクロシリンジで圧注入した。生存期間を3日間おいた後、深麻酔下で、心臓から4%パラホルムアルデヒド溶液を流し込み、脳を灌流固定した。頭部から取り出された脳は、凍結マイクロトームを使用して、厚さ30 $\mu$ mの連続横断切片とされた。中脳部位の切片は、直ちにスライドガラスへ貼り付けられ、蛍光顕微鏡の360nmの励起光下で観察し、フルオロゴールドの注入部位を同定した。中脳橋の部位の切片には、アセチルコリンおよびカルビンディンを検出するための免疫組織化学を、浮遊法によりおこなった。

切片を、正常ロバ血清で処理した後、ヤギ抗ChAT抗体およびマウス抗カルビンディン-D28K抗体と同時に反応させた。次に切片をビオチン化ロバ抗マウス抗体およびAlexaFluor 488 標識ロバ抗ヤギ抗体の混合液中で反応させたのち、さらにCy3標識ストレプトアビジンと反応させた。標本はグリセロールとリン酸緩衝液との混合液で封入後、蛍光顕微鏡下で観察した。アセチルコリン産生細胞であることを示すChAT免疫陽性細胞、およびカルビンディン免疫陽性細胞を、それぞれ中脳橋被蓋部域で同定するとともに、腹側被蓋野へ投射している細胞をあらゆるフルオロゴールドにより逆行性に標識された細胞を、同じく中脳橋被蓋部で同定した。波長480nmの励起光下でAlexaFluor 488は緑色の蛍光を発するので、ChAT免疫陽性細胞は緑色の蛍光を発する細胞として、また560nmの励起光下でCy3は赤色の蛍光を発するので、カルビンディン免疫陽性細胞は赤色の蛍光を発する細胞として観察される。さらに、360nmの励起光下では、フルオロゴールド標識細胞が金色の蛍光を発する細胞として観察される。中脳橋被蓋領域をそれぞれの励起光下で撮影し、その画像をコンピューター上で重ね合わせ処理を施し、それぞれの蛍光で単一に、あるいは異なる2種類の蛍光で二重に、さらには3種類すべての蛍光を発する三重に標識された細胞を検索した。結果として、フルオロゴールドでのみ標識された細胞のほか、ChAT免疫陽性を示しフルオロゴールドにより逆行性に標識された二重標識細胞、あるいはカルビンディン免疫陽性を示しフルオロゴールドで標識された二重標識細胞が、外背側被蓋核および脚橋被蓋核内に、それぞれ観察された。また、ChAT免疫陽性およびカルビンディン免疫陽性の両方を示す細胞は観察されなかった。これらのことから、外背側被蓋核および脚橋被蓋核のカルビンディン含有細胞に、腹側被蓋野へ投射するものが存在し、それらはグルタミン酸作動性、あるいはGABA作動性ニューロンと推察される。